

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月2日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21770032

研究課題名（和文） ICE1を中心とした低温シグナル伝達ネットワークの解析

研究課題名（英文） Elucidation of ICE1-dependent cold signaling network

研究代表者

三浦 謙治 (MIURA KENJI)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：00507949

研究成果の概要（和文）：

低温シグナル伝達因子 ICE1 の転写活性化様式を明らかにする目的で、ICE1 に点変異を導入したところ、ICE1 (S403A) では分解が抑制され、タンパク質が安定化することで低温耐性を促進していることを明らかにした。また、ICE1 の相互作用因子の単離を行い、MYC 型転写因子、キナーゼの他にカルモジュリン様タンパク質を同定した。カルモジュリン様タンパク質については、低温応答及び低温シグナル伝達に関わることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To identify the transactivation system of ICE1, which is a regulator of cold signaling, site-directed mutagenesis was introduced. Substitution of serine 403 to alanine inhibited degradation of ICE1, consequently, ICE1 (S403A) was stabilized. This stabilization leads to improving cold tolerance. And to understand the regulatory mechanisms of ICE1, interactors of ICE1 were isolated by yeast 2-hybrid screening. MYC-type transcription factors, kinases, and calmodulin-like proteins were identified as ICE1-interactors. Furthermore, the results suggested that calmodulin-like proteins are involved in regulation of cold signaling and cold tolerance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：低温シグナル伝達、ICE1 の安定化、カルモジュリン様タンパク質

1. 研究開始当初の背景

低温シグナル伝達に関わる既知因子として最上位として考えられる ICE1 の調節機構として、翻訳後修飾因子 SUMO が 393 番目のリジンにけつごうすることによって調節されることを研究代表者は明らかにしていた。し

かし、ICE1 の詳細な調節機構及び ICE1 自身の活性化に関する詳細な機構は分かっていなかった。研究代表者は SUMO 化部位 (K393) 周辺の配列が、ICE1 ホモログの間において非常に保存されていることを見出し、その周辺に点変異を導入した。すると 403 番目のセリ

ンを置換した ICE1 では転写活性化能が上昇することが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究では、ICE1 の調節機構を明らかにすることを目的として研究を行った。具体的には以下を目的とした。

(1) 転写活性化に関わる 403 番目のセリン残基の詳細な機構及び S403 の SUMO 化への影響を明らかにすること。

(2) ICE1 相互作用因子の単離及びその相互作用因子がどのように低温シグナル伝達に影響を与えているかを明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) S403 がもたらす転写活性化機構

① ICE1 (S403A) における低温応答への影響。ICE1 (WT) または ICE1 (S403A) を導入した形質転換植物を作製した。この際、後述の実験のため、ICE1 には T7 タグを融合させた。それらの植物体を低温に曝し、生存率を明らかにすることで凍結耐性を調べた。また、低温に曝した場合、細胞が破壊されることで細胞内のイオンが細胞外へ放出される。このイオンの放出を測定することで低温に強いかを明らかにすることができる。ICE1 (WT) 及び ICE1 (S403A) を低温に曝した後、イオン流出量を測定して、上記生存率とともに、低温耐性の評価として行った。

② 低温応答遺伝子の発現評価。ICE1 (WT) 及び ICE1 (S403A) 形質転換植物を低温に曝し、3, 6, 12, 24 時間後にサンプリングを行った。これらの植物体から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を作製した。この cDNA に対して、低温応答性遺伝子である *CBF1*, *2*, *3* 及び *COR47*, *KINI* 遺伝子特異的プライマーを用いて PCR を行った。この際、SYBR の DNA2 本鎖へのインターカレーションを指標として定量的 PCR を行った。

③ 低温時における ICE1 タンパク質の安定性。ICE1 は低温暴露後 16 時間以上経つと分解が始まる。そこで、ICE1 の安定性を調べるため、GFP-ICE1 (WT) 及び GFP-ICE1 (S403A) 形質転換植物を作製し、GFP の蛍光を低温処理前後で比較した。また①で作製した形質転換植物を用いて、ICE1 のタンパク質量を T7 タグ抗体によるウェスタンブロット解析により検出し、タンパク質量を比較した。

④ ユビキチン化の検証。上述のように ICE1 は低温暴露後に分解されるが、これはユビキチン E3 リガーゼ HOS1 によって ICE1 がポリユビキチン化を受け、プロテアソームによ

て分解される。ICE1 (WT) と ICE1 (S403A) のユビキチン化の様相を調べるため、T7 タグ抗体により免疫沈降を行った。その免疫沈降物に対して、ユビキチン抗体を用いたウェスタン解析を行った。また *in vitro* ユビキチンアッセイを行った。方法は、組換え HOS1 及び ICE1 (WT) または ICE1 (S403A) を作製し、ユビキチン化キットを用いて ICE1 に対するユビキチン化を行った。

(2) ICE1 相互作用因子の単離及び相互作用因子の低温シグナル、低温応答への影響評価

① BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) による確認。酵母 2 ハイブリッドシステムによってポジティブな結果が得られた因子に対して、相互作用の確認が必要である。その方法として BiFC 法を用いた。この方法は YFP を N 末と C 末に分割し、相互作用が見られないと、N 末又は C 末のみなので YFP の蛍光は見られないが、相互作用すると N 末と C 末が近接するため、相互作用が検出できる。ICE1 と N 末を融合させたプラスミドと相互作用因子と C 末を融合させたプラスミドを用意した。シロイヌナズナの葉にセルラーゼを加えて細胞壁を分解して、プロトプラストを作製した。上記プラスミドを PEG 法により導入した。24-48 時間培養後、YFP の蛍光を顕微鏡で観察した。

② 相互作用因子の低温耐性及び低温シグナルへの影響。相互作用因子の変異株又は過剰発現体を作成し、(1)①に示した方法で低温耐性を調べた。また、(1)②に示した方法で低温応答性遺伝子の発現を調べた。

③ カルモジュリン様タンパク質 (CML) と ICE1 の相互作用様式。一般的にカルモジュリンはカルシウムの添加によって構造が変化して相互作用しやすくなる。そこで、CML と ICE1 の相互作用がカルシウム依存性であるかを pull-down 法を用いて検出した。Pull-down の方法であるが、まず組換え ICE1-ProS2 タグ及び CML-MBP タグタンパク質を作製した。それらのタンパク質を混合し、ProS2 タグ抗体により免疫沈降を行い、SDS-PAGE で分画後、MBP 抗体で検出を行った。その際、カルシウムを添加、又はカルシウム特異的キレート剤である EGTA を添加した。また、共免疫沈降を行った。タバコに T7-ICE1 及び CML10-Flag を一過的に発現させた。その後、タバコ粗タンパク質から Flag 抗体で免疫沈降を行い、SDS-PAGE で分画後、T7 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。

4. 研究成果

(1) ICE1 (S403A) による低温耐性増強及びタンパク質の安定化。

①ICE1 (S403A) による転写活性化能の上昇及び低温耐性の上昇。SUMO 化部位 (K393) の近傍に位置するセリン及びスレオニン残基をアラニンに置換して転写活性化能を測定した。すると S403A に置換した場合に野生型 ICE1 と比較して転写活性化能が倍近く上昇した。そこで ICE1 (S403A) は ICE1 (WT) よりも高い能力を持つと考え、低温耐性を比較した。ICE1 (WT) と比較して、ICE1 (S403A) では凍結耐性が上昇した (図 1)。また、低温応答性遺伝子の発現状況を調べたところ、ICE1 (S403A) 形質転換植物において、低温応答性遺伝子の発現が上昇していた。

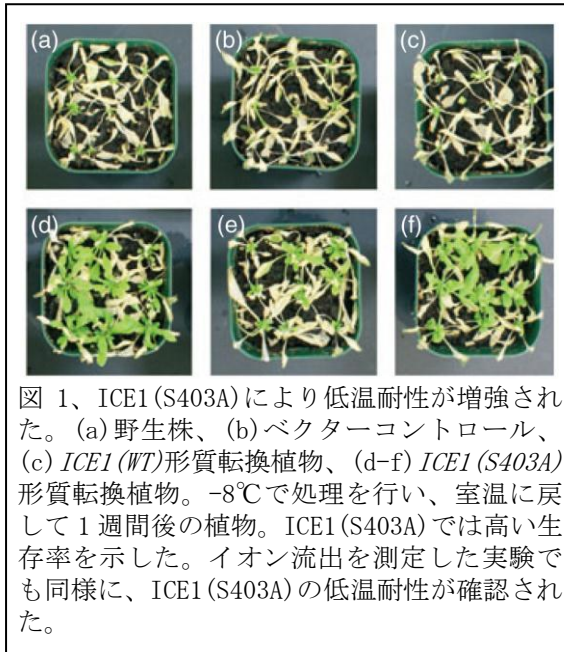


図 1、ICE1 (S403A) により低温耐性が増強された。(a) 野生株、(b) ベクターコントロール、(c) *ICE1* (WT) 形質転換植物、(d-f) *ICE1* (S403A) 形質転換植物。-8°C で処理を行い、室温に戻して 1 週間後の植物。ICE1 (S403A) では高い生存率を示した。イオン流出を測定した実験でも同様に、ICE1 (S403A) の低温耐性が確認された。

これらの植物が他に影響を調べたが、植物の伸長や生育、気孔の発達には野生株と同様の表現型を示した。また、*ICE1* (S403A) が機能的に *ICE1* (WT) と同様であることを確認するため、*ice1 scrm-2* 変異株に形質転換したところ、*ICE1* (WT) を導入しても *ICE1* (S403A) を導入しても、両方とも変異株を相補することが出来たため、両者に機能的な差異 (低温耐性増強以外) は認められなかった。

②ICE1 (S403A) タンパク質の安定化。次にどのようにして、ICE1 (S403A) が低温耐性を増強したのかについて明らかにするため、ICE1 (S403A) と ICE1 (WT) のタンパク質量を比較した。通常 ICE1 は低温に 16 時間以上曝されると分解されることが知られている。そこで、低温処理前後で ICE1 タンパク質量をウェスタンブロット解析により調べたところ、ICE1 (S403A) ではタンパク質の分解が抑制されていた (図 2a)。同様にタンパク質量を GFP による蛍光を指標に調べた結果、ICE1 (S403A) において GFP の蛍光の減少が ICE1 (WT) に比べて抑制されているのが確認された (図 2b)。このことは、S403A の置換に

よって ICE1 タンパク質の安定性が増したということである。

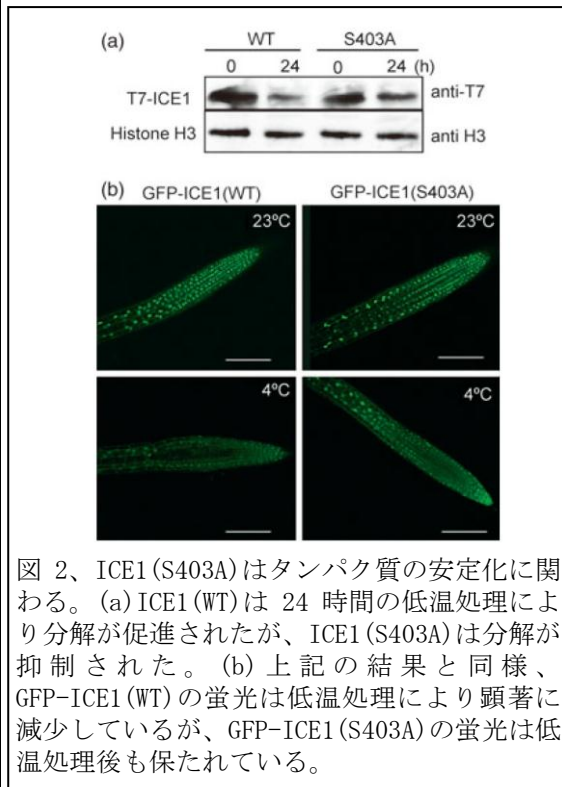


図 2、ICE1 (S403A) はタンパク質の安定化に関わる。(a) ICE1 (WT) は 24 時間の低温処理により分解が促進されたが、ICE1 (S403A) は分解が抑制された。(b) 上記の結果と同様、GFP-ICE1 (WT) の蛍光は低温処理により顕著に減少しているが、GFP-ICE1 (S403A) の蛍光は低温処理後も保たれている。

低温処理後の ICE1 の分解にはユビキチン E3 リガーゼ HOS1 を介したポリユビキチン化が関与していることが分かっている。そこで ICE1 のポリユビキチン化に違いが生じているかを調べた。T7-ICE1 (WT) 及び T7-ICE1 (S403A) を T7 抗体を用いて免疫沈降を行ったあと、ユビキチン抗体を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、ICE1 (WT) ではポリユビキチン化されたバンドが検出された。しかし、ICE1 (S403A) においてはポリユビキチン化されたバンドは検出されなかった (図 3)。ただし、*in vitro* におけるユビキチン化アッセイを行ったが、ICE1 (S403A) でもユビキチン化された。

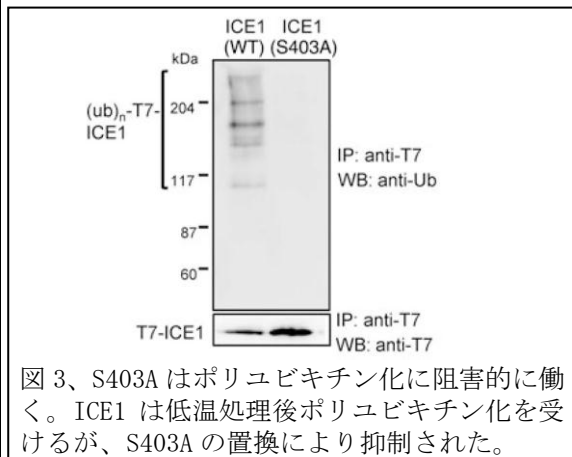


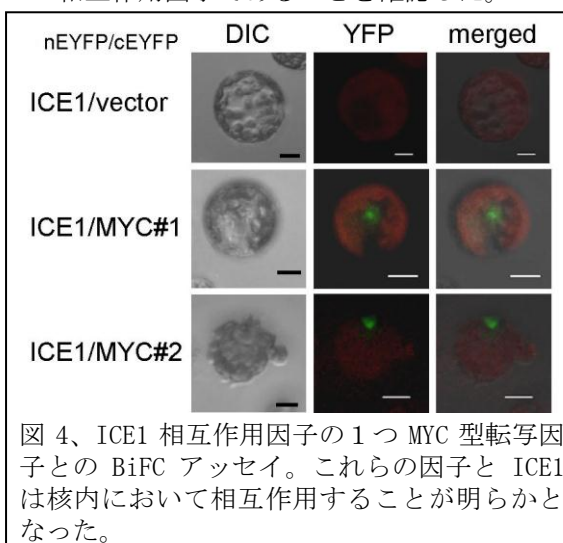
図 3、S403A はポリユビキチン化に阻害的に働く。ICE1 は低温処理後ポリユビキチン化を受けるが、S403A の置換により抑制された。

これらのことから、S403 が直接のユビキチン化部位でなく、細胞内において S403 に何

らかの修飾が行われることで、ユビキチン化に阻害的に働いている可能性が示唆された。また、S403A 置換が SUMO 化に与える影響を調べたが、特に変化は見られなかった。以上の結果から、S403A の置換により ICE1 タンパク質が安定化することで、低温シグナル及び低温耐性が増強されたと考えられる。

(2) ICE1 相互作用因子の解析

① ICE1 相互作用因子を単離し、BiFC 法により相互作用を確認した。確認した因子は、キナーゼ、カルモジュリン様タンパク質、及び MYC 型転写因子である。ICE1 は核に移行することが分かっているため、これらの相互作用因子は核内において相互作用が見られた(図 4)。このことから、今回単離した因子は ICE1 の相互作用因子であることを確認した。



次にカルモジュリン様タンパク質(CML)についてより詳細に研究を行った。カルモジュリン様タンパク質の過剰発現体及び RNAi による発現抑制体を作出した。これらの植物体を用いて低温耐性を調べたところ、過剰発現体において低温耐性を示し、RNAi 発現抑制体では低温感受性を示した。

また、これらの植物体における低温応答性遺伝子の発現を調べたところ、過剰発現体では遺伝子の発現が促進されており、RNAi 発現抑制体では低温応答性遺伝子の発現が抑制されていることが明らかとなった。

②カルモジュリンはカルシウムの添加により構造変化させることが知られている。このことはカルシウムの有無によって相互作用の様相も変化する可能性があることを示唆している。このことを確かめるため、pull-down 法を用いた相互作用を調べた。組換えタンパク質を調整し、ICE1 と CML の相互作用を調べたところ、カルシウムの添加によって相互作用が強まった。逆にカルシウムのキレート剤である EGTA を添加したところ、

相互作用は弱まった。これらのことから、ICE1 と CML の相互作用はカルシウム依存的であると考えられる。

通常、植物は低温刺激によって細胞質及び核内に一過的にカルシウムを放出して、カルシウム濃度が上昇することが知られている。上述のように ICE1 と CML の結合がカルシウムによって強まったことを考えると、ICE1-CML 結合が低温でも強まることが考えられる。そこで、ICE1 及び CML を発現させて、低温処理前後で共免疫沈降を行った結果、低温処理後に相互作用が強まること明らかとなった。

以上の結果から、CML は低温刺激によって ICE1 との結合を促進することによって、低温シグナル及び低温応答を調節していると考えられる。これまで、低温によって細胞内へのカルシウムの放出は分かっていたが、どのようにカルシウムの放出をデコードして低温シグナル伝達へとつなげるかに関しては全く分かっていなかった。今回 ICE1 と相互作用する CML が明らかとなったことで、この CML がカルシウム放出から低温シグナル伝達への受け渡しをしている可能性が考えられる。実際には CML はシロイヌナズナにおいて 50 種類あるが、今回明らかにした因子が特異的に ICE1 と相互作用するかどうかを明らかにする必要がある。また、低温時におけるカルシウム放出がどのようなメカニズムによって引き起こされるのかについても明らかにする必要がある。これらの機構が明らかになれば、低温刺激によるカルシウム放出、それに続くカルシウムシグナルのデコードと低温シグナル伝達への受け渡しという、所謂シグナル伝達の上から下までつながることになる。本研究はその一翼を担っており、そのインパクトは非常に大きいと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Miura K 他 4 名 (2011) ICE1 Ser403 is necessary for protein stabilization and regulation of cold signaling and tolerance. *Plant J.* 67: 269-279、査読有
- ② Sato A, Miura K (2011) Root architecture remodeling induced by phosphate starvation. *Plant Signal. Behav.* 6:1122-1126、査読無
- ③ Miura K, Lee J, Miura T, Hasegawa PM (2010) *SIZ1* controls cell growth and plant development in Arabidopsis through salicylic acid. *Plant Cell Physiol.* 51: 103-113、査読有

- ④ Miura K, Ohta M (2010) SIZ1, a small ubiquitin-related modifier ligase, controls cold signaling through regulation of salicylic acid accumulation. *J. Plant Physiol.* 167: 555-560、査読有
- ⑤ Lissarre M, Ohta M, Sato A, Miura K (2010) Cold-responsive gene regulation during cold acclimation in plants. *Plant Signal. Behav.* 5: 948-952、査読無
- ⑥ Miura K, Hasegawa PM (2010) Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants. *Trends Cell Biol* 20: 223-232、査読無

[学会発表] (計 8 件)

- ① 三浦謙治 Regulatory mechanisms of ICE1 for cold signaling and tolerance. *The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing* 2012 年 3 月 20 日 東大寺総合文化センター(奈良)
- ② 三浦謙治 SIZ1 における PHD ドメインの役割及び SIZ1 とサリチル酸の関連性 第 8 回 SUMO 研究会 2010 年 11 月 26 日 筑波大学(つくば)
- ③ 三浦謙治、太田賢、Paul M. Hasegawa Enhancement of ICE1 activity for cold tolerance by substitution of serine 403, which regulates ubiquitylation of ICE1. *21th International Conference on Arabidopsis Research* 2010 年 6 月 8 日 パシフィコ横浜(横浜)
- ④ 三浦謙治、太田賢、Paul M. Hasegawa ICE1 活性化による凍結耐性の向上。 日本農芸化学会 2010 年度大会 2010 年 3 月 28 日 東京大学(東京)
- ⑤ 太田賢、Jian-Kang Zhu、Paul M. Hasegawa、三浦謙治 ICE1 と相互作用する MYC67, 70, 71 は低温応答の負の制御因子である。 第 51 回日本植物生理学会 2010 年 3 月 18 日 熊本大学(熊本)

[その他]

ホームページ等

<http://www.gene.tsukuba.ac.jp/~kmiura/>

<http://wakate.biol.tsukuba.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 謙治 (MIURA KENJI)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：00507949